

КОНЫШЕВ ИЛЬЯ ВЛАДИМИРОВИЧ

**РОЛЬ ПОВЕРХНОСТНЫХ АНТИГЕНОВ В АДГЕЗИВНОСТИ БАКТЕРИЙ  
*YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* К МАКРОФАГАМ J774**

03.02.03 - микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Работа выполнена на кафедре биотехнологии Института биологии и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Вятский государственный университет»

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук,  
профессор кафедры биотехнологии,  
Институт биологии и биотехнологии,  
Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
образования «Вятский государственный  
университет»

**Бывалов Андрей Анатольевич**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук,  
профессор кафедры микробиологии,  
биотехнологии и химии,  
Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
образования «Саратовский государственный  
аграрный университет им. Н.И. Вавилова»

**Фёдорова Валентина Анатольевна**

кандидат биологических наук,  
доцент кафедры микробиологии, Институт  
фундаментальной медицины и биологии,  
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего  
образования «Казанский (Приволжский)  
федеральный университет»

**Яруллина Дина Рашидовна**

**Ведущая организация:**

Федеральное бюджетное учреждение науки  
«Государственный научный центр прикладной  
микробиологии и биотехнологии», г. Оболенск

Защита состоится 28 сентября 2017 г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.36 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 74, Институт фундаментальной медицины и биологии в зале заседания учёного совета, тел./факс (843) 238-71-21, 233-78-40.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 года

Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук,  
профессор



З.И. Абрамова

**Актуальность темы исследования и степень её разработанности.** В настоящее время бактериальная адгезивность рассматривается как один из главных факторов реализации патогенного потенциала возбудителей инфекционных заболеваний на стадии первичного контакта с клетками организма хозяина [Cabrijan L., 2011; Bonazzi M., 2011; Hauck C.R., 2006; Hall-Stoodley L., 2004]. Изучение механизмов микробной адгезивности представляет значительный интерес для медицинской микробиологии, физиологии микроорганизмов, вакцинологии, молекулярной биологии, эпидемиологии [Klinth J.E., 2012; Galy O., 2014; Lau P.C., 2009].

Род *Yersinia* включает три вида патогенных для человека грамотрицательных бактерий: *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*. Первые два вида являются энтеропатогенами, входными воротами для которых служит слизистая тонкого кишечника. Передаваясь алиментарным путём (с загрязнённой пищей или водой), они вызывают заболевания, протекающие с симптомами энтероколита с сопутствующими поражениями Пейеровых бляшек и регионарных лимфатических узлов, нередко переходящие в хроническую форму [Hill A., 2015; Galindo C.L., 2011]. У пациентов с иммунодефицитными состояниями отмечается генерализованная септическая форма, смертность от которой составляет около 50% для инфекции *Y. enterocolitica* [Cover T.L., 1989] и более 75% для псевдотуберкулёза [Deacon A.J., 2003].

Бактерии *Y. pestis* вызывают тяжелое системное заболевание, передаваемое либо через укус блох, либо аэрогенно. Практика специальных противоэпидемических мероприятий в отношении иерсиний имеет существенные недостатки. По-прежнему не разработаны вакцины к инфекциям, вызываемым *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, а используемая в настоящее время живая чумная вакцина EV обладает высокой реактогенностью, средства иммунохимической диагностики иерсиниозов недостаточно чувствительны и/или специфичны.

Наибольшее количество зарегистрированных случаев псевдотуберкулёза и иерсиниозного энтероколита отмечается в странах Северной, Центральной Европы, а также в Канаде [Galindo C.L., 2011]. В России, по данным Роспотребнадзора, общая заболеваемость псевдотуберкулёзом за 2014 и 2015 годы составила 0.98 и 0.77 на 100 тыс. населения, соответственно, что сопоставимо с такими инфекционными заболеваниями, как корь и менингококковая инфекция. Относительно высок показатель заболеваемости среди детей до 17 лет – 3.37 (2014 г.) и 2.79 (2015 г.) на 100 тыс. населения, соответственно.

Особую проблему представляет рост антибиотикорезистентности возбудителей инфекционных заболеваний. В связи с вышеизложенным необходимым представляется дальнейшее изучение на клеточном и субклеточном уровнях механизмов патогенеза инфекций, вызываемых бактериями рода *Yersinia*. Это относится прежде всего к начальной стадии заболеваний, а именно первичному контакту бактерии с клетками хозяина, значимости в этом взаимодействии поверхностных структур возбудителя.

Основным компонентом наружной мембраны грамотрицательных бактерий, покрывающим, по оценкам разных авторов, до 75% поверхности микроба, является липополисахарид (ЛПС) [Lu Q., 2011]. Такое высокое его содержание в наружной мембране и морфологическая картина его экспрессии на поверхности микробной клетки сами по себе предполагают участие ЛПС в первичном контакте бактерии и эукариота – положительное или даже отрицательное. Прямых экспериментальных данных об участии ЛПС в адгезивности бактерий к эукариотам практически нет, а вопрос о роли О-боковых цепей (О-антигена) в процессе адгезии и инвазии бактерий является предметом научной дискуссии. В части работ, выполненных с использованием

микробиологических методов, показана значимость О-антигена в процессах адгезии и инвазии бактерий (*Shigella flexneri* [Hoare A., 2012; West N.P., 2005; Kohler R., 2002], *Salmonella enterica* [Hoare A., 2006], *C. jejuni* [Kanipes M.I, 2004], *E. coli* [Klena J., 2005], *P. aeruginosa* [Zaidi T.S., 1996]). В работе Okamura [Okamura N., 1977], посвящённой изучению влияния О-антигена на адгезивные свойства *Shigella flexneri*, это отрицается.

Малоизученной остаётся роль в процессах микробной адгезии поринов – наиболее распространённых интегральных гомотримерных белков наружной мембраны ( $10^5$  молекул на клетку) грамотрицательных бактерий [Rosenbusch J.P., 1974; Nikaido H., 1996]. Являясь многофункциональными белками, порины обеспечивают транспорт некоторых нутриентов и ряда ксенобиотиков, рецепцию бактериофагов [Liu X., 2001; Ceccarelli M., 2004; Zhao X., 2013], некоторые (например, Sfr из *Y. enterocolitica* [Mildiner-Earley S., 2006]) являются адгезинами.

При оценке адгезивных и инвазивных свойств бактерий широко используются рутинные микробиологические методики [Darfeuille-Michaud A., 1990; Moroni O., 2006; Jankowska A., 2008], дающие только общую, интегральную характеристику бактериальной адгезии, и позволяющие лишь приблизительно судить о роли конкретных поверхностных компонентов возбудителя в этом процессе. В настоящее время с этой целью всё чаще используются современные биофизические подходы, среди которых особое место занимают атомно-силовая микроскопия [Goulter R.M., 2009; Alsteens D., 2013] и метод оптической ловушки [Ikai A.I., 2010]. Существенным преимуществом последних является возможность создания и использования моделей прокариоцитов с заданными иммунохимическими свойствами. В качестве носителя в опытах с использованием оптической ловушки используются подложки из неорганического субстрата (золота) [Liang M.N., 2000], латексные [Fallman E., 2004] или полистироловые [Simpson K.H., 2003; Sieben C., 2012] микросферы,

Данные экспериментов, проведённых с использованием атомно-силового микроскопа, в которых изучалась значимость ЛПС в адгезии бактерии к неорганическому субстрату, недостаточны для объяснения процессов, лежащих в основе первичного контакта «микроб – эукариоцит». В любом случае для понимания механизмов взаимодействия макроорганизма с бактерией, роли в этом взаимодействии ЛПС, его химического состава необходимо проведение исследований, в которых вторым партнером системы, наряду с бактериальной клеткой (или моделирующей ее структурой, экспонирующей на своей поверхности исследуемый ЛПС либо его компоненты), является эукариоцит хозяина.

Несмотря на широкое применение метода оптической ловушки в молекулярно-биологических исследованиях белков, нуклеиновых кислот и их комплексов [Gutierrez-Medina B., 2009; Dholakia K., 2006; Lisica A., 2016], а также при изучении микромеханических свойств мембран клеток [Araya M., 2016], зависимость адгезивности бактерий, в том числе и рода *Yersinia*, к эукариотам от химического состава поверхностных структур возбудителей с помощью лазерного пинцета ранее не изучалась.

**Цель и задачи работы.** Цель работы заключалась в исследовании значимости поверхностных антигенов (ЛПС и порина OmpF) в адгезивности *Yersinia pseudotuberculosis* к макрофагам J774 в модельной системе «прокариоцит – эукариоцит» методом оптической ловушки.

В связи с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

1. Экспериментально обосновать методические подходы к иммунохимической функционализации микросфер для оценки значимости поверхностных антигенов *Yersinia pseudotuberculosis* в адгезивности бактерий;
2. Разработать способ регистрации силы взаимодействия между микросферами и поверхностью жизнеспособных эукариоцитов с помощью оптического пинцета;
3. Выявить роль О-боковых цепей ЛПС и порина OmpF в адгезивности клеток *Yersinia pseudotuberculosis* к макрофагам J774 методом оптической ловушки.

**Научная новизна.** В ходе исследований разработаны методические подходы к иммунохимической функционализации микросфер, основанные на их сенсибилизации антигенами иерсиний (ЛПС и порина OmpF) с последующей обработкой антителосодержащими препаратами различной специфичности. Обоснован способ количественной оценки сил связывания функционализированных микросфер с эукариоцитами методом оптической ловушки, подтвержденный получением патента №2604191; сформулированы критерии физического контакта между исследуемыми микросферами и эукариоцитами. С помощью лазерного пинцета установлена существенная роль О-боковых цепей ЛПС и порина OmpF в адгезивности бактерий *Y. pseudotuberculosis* к макрофагам J774.

**Научно-практическая значимость.** Полученные оригинальные результаты имеют важное научно-практическое значение для понимания роли ЛПС и порина OmpF *Y. pseudotuberculosis* в обеспечении адгезивности патогена к эукариоцитам. Разработанный способ регистрации силы взаимодействия модельных микросфер с клетками-мишенями может быть востребован в аналогичных исследованиях по оценке вклада того или иного антигена в адгезивную способность конкретного возбудителя, что может быть использовано при разработке лечебных, профилактических и диагностических препаратов.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Разработаны методические подходы к иммунохимической функционализации полистироловых микросфер, позволяющие оценивать вклад поверхностных антигенов в адгезивность бактерий к эукариоцитам методом оптической ловушки.
2. Экспериментально обоснован количественный способ оценки силы связи между макрофагом и функционализированными микросферами с использованием лазерного пинцета.
3. Установлена значимость в адгезивности бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* О-боковых цепей липополисахарида и порина OmpF к макрофагам J774.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационной работы были изложены на II Всероссийской молодёжной научной конференции «Молодёжь и наука на Севере» (Сыктывкар, 2013), XIII Всероссийской молодёжной научной конференции Института физиологии Коми НЦ УрО РАН «Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике», XI Всероссийском съезде по фундаментальным проблемам теоретической и прикладной механики (Казань, 2015), на V съезде биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015), на III Всероссийской научной конференции молодых учёных «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2016).

**Личный вклад автора.** Основные результаты получены автором самостоятельно. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались лично и совместно с научным руководителем. Автор лично выполнял методики и обобщал полученные результаты. Выводы сделаны на основе собственных оригинальных данных. Микробиологические, иммунохимические исследования, работа с

перевиваемыми клеточными культурами проводились на кафедре биотехнологии Вятского государственного университета (ВятГУ) и в лаборатории физиологии микроорганизмов Института физиологии Коми НЦ УрО РАН (г. Киров), просвечивающая электронная микроскопия, а также работы с лазерным пинцетом выполнялись на базе НОЦ по направлению нанотехнологии ВятГУ. Выделение порина OmpF производилось сотрудниками лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН (г. Владивосток).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, включая 4 статьи из списка ВАК, 8 тезисов в сборниках статей и материалов конференций и 1 патент на изобретение

**Структура и объём диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и библиографического списка, который включает 265 наименований, из них 10 отечественных и 255 иностранных. Работа изложена на 119 страницах машинописного текста, содержит 23 рисунка и 5 таблиц.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю – доктору медицинских наук Бывалову Андрею Анатольевичу профессору кафедры биотехнологии ВятГУ за всестороннюю поддержку в проведении исследований; доктору физико-математических наук, ведущему научному сотруднику Института биохимической физики РАН им. Н.М. Эммануэля Кононенко Вадиму Леонидовичу за ценные теоретические и практические рекомендации при проведении исследований с использованием лазерного пинцета; коллективу лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН за предоставленные образцы порина; коллективу кафедры биотехнологии ВятГУ за помощь и поддержку во время выполнения и обсуждения диссертационной работы.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

Представлен обзор литературы, содержащий краткую информацию о современных биофизических методах исследования, применяемых в молекулярной и клеточной биологии (атомно-силовая микроскопия, диэлектрофорез, магнитный пинцет, оптический пинцет). Более подробно описано устройство, принцип работы и способ калибровки оптического пинцета, использованного в настоящей работе. Представлен анализ состояния современных экспериментальных исследований с применением метода оптической ловушки на разных уровнях организации биологических систем (молекулярном, субклеточном и клеточном). Рассмотрены используемые в настоящее время модели для изучения взаимодействия в системе «прокариоцит-эукариоцит» как с использованием живых клеток, так и их моделей. В заключение приводится информация об основных адгезинах бактерий рода *Yersinia* и анализируются данные о влиянии поринов и липополисахарида на адгезивные свойства грамотрицательных бактерий.

### **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

#### **Объект исследования**

Исследования проводили с использованием полистироловых микросфер с заданными иммунохимическими свойствами – моделях клеток *Y. pseudotuberculosis*. Разработку способа оценки силовых характеристик взаимодействия в системе «модель

прокариоцита – эукариоцит» и непосредственно сами исследования осуществляли на монослойной культуре мышинных макрофагов линии J774 (клеточная линия получена из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН).

**Штаммы и условия культивирования.** В работе использовали штамм EV *Y. pestis* и штамм 1b *Y. pseudotuberculosis* (кат. № 474), полученные из коллекции Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб». Выбор штамма возбудителя псевдотуберкулёза был обусловлен имеющимися сведениями о том, что именно серовар 1 обуславливает большую часть (88 – 97.5%) случаев заболевания (Сомов Г.П., 1979). Штамм EV *Y. pestis* использовался нами в качестве контроля как лишённый О-боковых цепей (Knirel Y.A., 2012). Бактерии *Y. pseudotuberculosis* выращивали во встряхиваемых колбах Эрленмейера с жидкой питательной средой на основе солянокислотного гидролизата казеина при температуре 10 °С в течение 96 ч, *Y. pestis* – при температуре 27 °С в течение 30 ч.

**Выделение ЛПС.** Препараты ЛПС выделяли из культур иерсиний методом Вестфаля с помощью водно-фенольной экстракции [Westphal O., 1965] и очищали трехкратным ультрацентрифугированием (105000 g, 3 ч); содержание в них примесных белков не превышало 1.5%. Препараты ЛПС, выделенные из культуры *Y. pseudotuberculosis*, обозначены далее символом ЛПС-10, из культуры *Y. pestis* – ЛПС-EV.

**Использованные антителосодержащие препараты.** Гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела (МКАт), были получены ранее. МКАт2 комплементарны эпитопам, расположенным на О-боковых цепях ЛПС [Byvalov A.A. et al., 2014], МКАт7 – на белковых компонентах наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis* [Byvalov A.A. et al., 2015].

В работе также использовали поливалентную чумную агглютинирующую сыворотку (ПЧС) производства Федерального казённого учреждения здравоохранения «Научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», которую получали путем гипериммунизации животного-донора (лошадь) культурой штамма EV *Y. pestis*. Для обработки микросфер использовали цельные (неразведенные) препараты ПЧС и асцитных жидкостей, содержащих МКАт2 или МКАт7. Для получения асцитных жидкостей культуры соответствующих гибридом в дозе  $(3-4) \cdot 10^6$  клеток внутрибрюшинно вводили мышам линии BALB/c и через 10 суток отсасывали и центрифугировали содержимое брюшной полости. Полученные надосадочные жидкости, обозначенные как МКАт2 и МКАт7, представляли собой использованные в работе асцитные жидкости.

**Приготовление конъюгата коллоидного золота с антителами к О-боковым цепям ЛПС *Y. pseudotuberculosis*.**

Для микроскопического подтверждения факта сенсibilизации микросфер препаратом ЛПС-10 готовили конъюгаты коллоидного золота с иммуноглобулинами, выделенными из поликлональной антисыворотки (ПКАт) и асцитной жидкости (МКАт4), содержащих антитела к О-боковым цепям ЛПС *Y. pseudotuberculosis*. Кратко: при комнатной температуре суспензию коллоидного золота 20 мин инкубировали в ФБР (рН 7,2) с указанными антителами в конечной концентрации 100 мкг/мл, добавляли бычий сывороточный альбумин (БСА) до конечной концентрации 0.12% и через 1 ч инкубации при комнатной температуре центрифугировали при 18 000 g в течение 30 мин. Осадок дважды отмывали в ФБР при тех же условиях центрифугирования. К осадку конъюгата добавляли БСА до конечной концентрации 0.1% и консервировали в 0.01% азида натрия. Полученные конъюгаты обозначали как «ПКАт-К» и «МКАт4-К»

**Просвечивающая электронная микроскопия.** Перед микроскопией исследуемые препараты микросфер, сенсibilизированных препаратами ЛПС-10 и БСА (контроль), термостатировали в течение 1 часа при 37 °С с конъюгатом коллоидного золота с антителами к О-боковым цепям ЛПС в объёмном соотношении 1:1 и наносили на медные сеточки (200 меш, SPI Supplies, США), покрытые углеродной пленкой-подложкой, сорбировали 2 мин, убирали избыток жидкости фильтровальной бумагой, сушили препарат. Снимки получали на электронном микроскопе JEM-2100 («Jeol», Япония) при ускоряющем напряжении 160 кВ. Фотографирование осуществляли с использованием CCD камеры Keen View («Olympus», Германия).

**Пробоподготовка эукариоцитов.** В экспериментах с использованием лазерного пинцета применяли культуру макрофагов J774. Макрофаги асептически пересевали на чашку "Fluorodish" диаметром 35 мм (WPI, США) с 2 мл среды RPMI-1640, содержащей гентамицин (100 мкг/мл), до конечной концентрации  $(10-30) \times 10^3$  клеток/мл, инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>) при 37 °С в течение 18-20 ч. Для измерений чашку с клетками закрепляли на термостатируемом (37 °С) пьезостолике инвертированного микроскопа лазерного пинцета, трижды промывали фосфатным буферным раствором (ФБР). После заключительной отмывки в чашку добавляли 2.3 мл ФБР и 2-4 мкл суспензии сенсibilизированных микросфер.

**Измерительная установка.** Измерения сил отрыва сенсibilизированных микросфер от поверхности макрофагов выполнены методом лазерного пинцета с помощью прибора NanoTracker™ (JPK Instruments AG, Германия). В приборе использован инвертированный микроскоп Nikon Eclipse с объективом 60х, NA=1,2 и лазер с длиной волны 1064 нм для формирования оптической ловушки и регистрации смещений захваченной микросферы. Коэффициент жёсткости ловушки для полистироловой микросферы диаметром 1 мкм составляет 0.05-0.40 пН/нм, в зависимости от мощности лазера, регулируемой в пределах 0.20-1.45 Вт. Измерение коэффициента чувствительности квадрантного фотодетектора (КвФД), регистрирующего смещение микросферы, а также коэффициента жёсткости ловушки производится в автоматическом режиме на основе регистрации частотного спектра броуновских смещений микросферы в ловушке [Wozniak A., 2009].

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенных исследований для разработки способа определения адгезивности в модельной системе «бактерия – эукариоцит» методом оптической ловушки были экспериментально обоснованы методические подходы к иммунохимической функционализации полистироловых микросфер с использованием препаратов ЛПС (подраздел 3.1) и порина Omp F (подраздел 3.2).

### 3.1. Функционализация микросфер с использованием препаратов ЛПС-10 и ЛПС-EV

#### 3.1.1. Сенсibilизация микросфер препаратами ЛПС

Препараты ЛПС до сенсibilизации подвергались центрифугированию (13000 g, 15 мин) для освобождения от крупномолекулярных комплексов. Суспензию полистироловых микросфер (Polysciences, Inc., США) диаметром 1 мкм в концентрации 2.5% (вес/объём) объединяли с полученными надосадочными жидкостями препаратов ЛПС и инкубировали на термошейкере (+37 °С, 290 RPM). После центрифугирования (13000 g, 15 мин) осадок ресуспендировали в блокирующем буфере (1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 0.05% Твин-20) и встряхивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Осадок после центрифугирования суспензии



заблокированных микросфер (13000 g, 15 мин) отмывали в ФБР и ресуспендировали в ФБР до концентрации микросфер, равной 0.25% (вес/объём). Параллельно в идентичных условиях готовили препарат контрольных микросфер, сенсibilизированных раствором БСА (1.0%).

### 3.1.2. Обработка сенсibilизированных микросфер препаратами моноклональных антител

Одну треть объёма сенсibilизированных ЛПС-10 микросфер (0.25%) объединяли в объёмном соотношении 1:1 с асцитной жидкостью, содержащей МКАт2, вторую треть – с асцитной жидкостью, содержащей МКАт7. После встряхивания (37 °С, 2 ч) суспензии микросфер центрифугировали (13000 g, 15 мин), дважды отмывали в ФБР. Осадки микросфер ресуспендировали в ФБР до концентрации 0.25%.

По идентичной схеме микросферы, сенсibilизированные ЛПС-EV, обрабатывали ПЧС и асцитной жидкостью, содержащей МКАт2.

Все 7 препаратов микросфер обозначили как «ЛПС-10», «ЛПС-EV», «БСА» (сенсibilизированы соответствующими препаратами ЛПС и БСА), «ЛПС-10+МКАт2», «ЛПС-10+МКАт7», «ЛПС-EV+МКАт2» и «ЛПС-EV+ПЧС» (сенсibilизированные препаратами ЛПС микросферы обработаны соответствующими антителами) и хранили при температуре +4 °С в ФБР с добавлением 0.01% азида натрия.

### 3.1.3. Верификация факта сенсibilизации микросфер ЛПС-10

Факт сенсibilизации микросфер препаратом ЛПС-10 был верифицирован с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Для этого подсчитывали число частиц конъюгата коллоидного золота с антителами к О-боковым цепям, прикрепившихся к произвольно выбранным микросферам, покрытым ЛПС-10 и БСА (контроль). Средние значения количества указанных частиц в пересчете на одну микросферу составили: для конъюгата «МКАт4-К» –  $19.4 \pm 7.4$  (n=34) и  $7.6 \pm 4.4$  (n=37); для конъюгата «ПКАТ-К» –  $12.1 \pm 5.9$  (n=47) и  $1.2 \pm 2.8$  (n=52) (Рисунок 1). Это свидетельствует о специфическом взаимодействии антител в составе обоих конъюгатов с ЛПС-10 в качестве сенситина микросфер (Рисунки 1, 2).

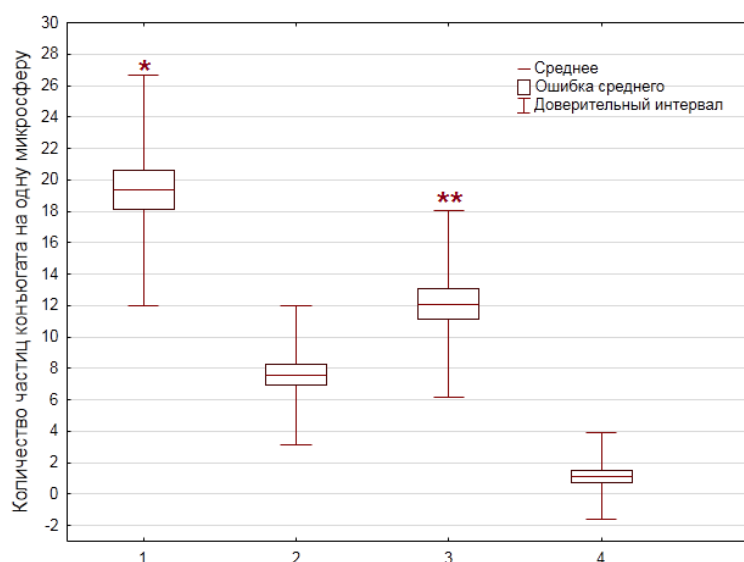


Рисунок 1 – Взаимодействие конъюгатов двух типов с микросферами «ЛПС-10» и «БСА»: 1 – «ЛПС-10 + МКАт4-К» (n=34), 2 – «БСА + МКАт4-К» (контроль №1, n=37), 3 – «ЛПС-10 + ПКАТ-К» (n=47), 4 – «БСА + ПКАТ-К» (контроль №2, n=52); \*, \*\* – результаты достоверно отличаются от соответствующих контролей по t-критерию ( $p < 0.05$ ).

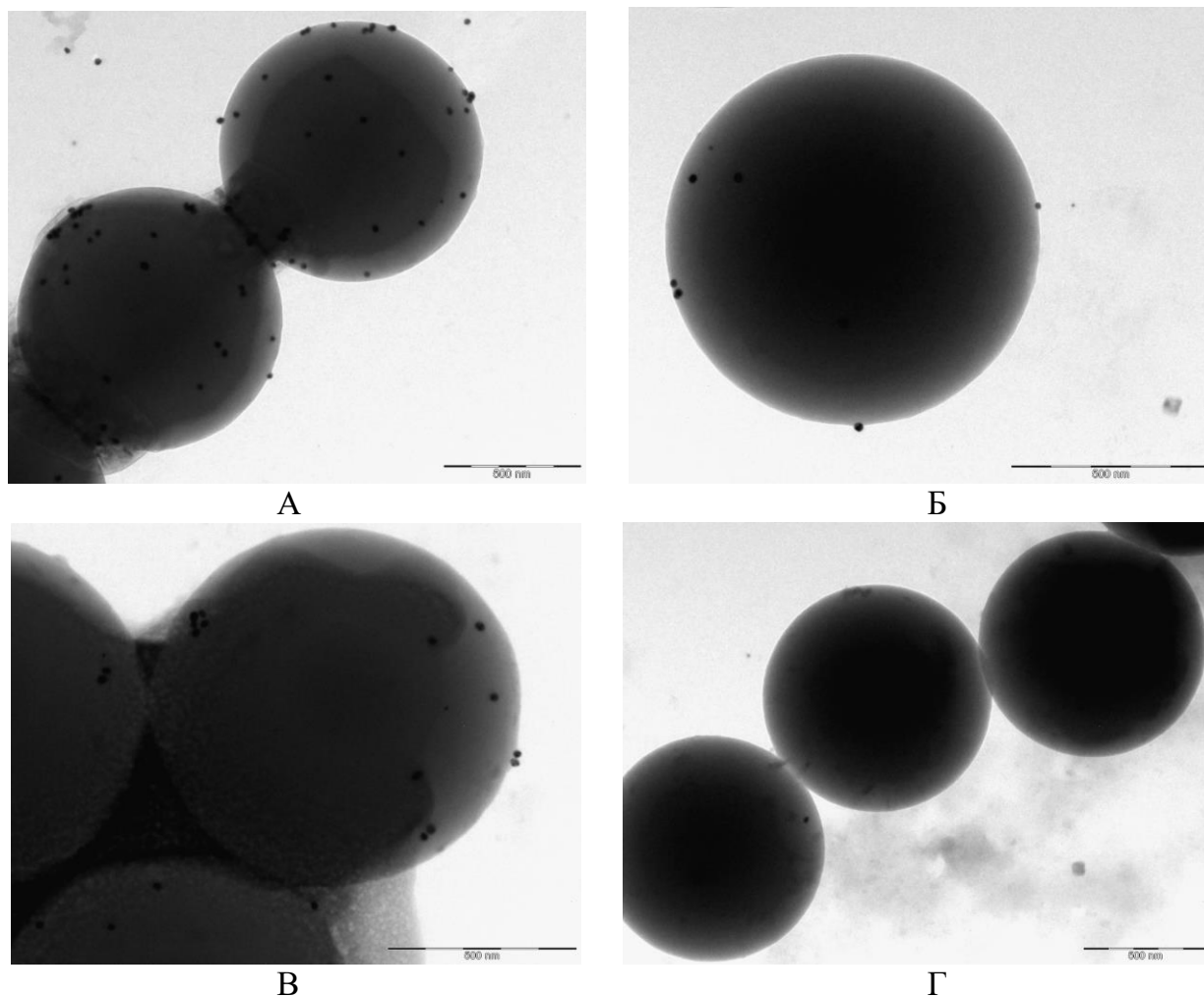


Рисунок 2 – Микросферы, покрытые ЛПС-10 (А, В) и БСА (Б, Г) после обработки конъюгатами коллоидного золота «МКАт4-К» (А, Б) и «ПКАт-К» (В, Г). Просвечивающая электронная микроскопия.

Каких-либо различий между интактными, необработанными конъюгатом, микросферами «ЛПС-10» и «БСА» с помощью электронной просвечивающей и сканирующей микроскопии не выявлено.

### 3.2. Функционализация микросфер с использованием препарата OmpF

#### 3.2.1. Сенсibilизация микросфер препаратом порина OmpF

Препарат порина в концентрации 0.69 мг/мл, хранившийся в 0.1%-ном растворе цвиттергента 3-14, предварительно диализованный против карбонат-бикарбонатного буфера (КББ, pH=9.5), смешивали с суспензией полистироловых микросфер диаметром 1 мкм в концентрации 2.5% (вес/объем) в соотношении 1:2. Последующие процедуры идентичны тем, что использовались для сенсibilизации микросфер препаратами ЛПС. Полученный препарат микросфер обозначали как «OmpF».

#### 3.2.2. Верификация факта сенсibilизации микросфер препаратом порина OmpF

Для верификации факта сенсibilизации микросфер препаратом порина OmpF использовали метод твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА).

Лунки 96-луночного планшета сенсibilизировали препаратом порина OmpF (5 мкг/мл белка в КББ) в течение 18 часов и трижды промывали ФБР с 0.05% Твина-20. Предварительно готовили препараты неиммунной и анти-OmpF сывороток в разведении 1:4500 на основе ФБР, после чего к 200 мкл каждой сыворотки добавляли 20 мкл суспензии микросфер «OmpF» и «БСА» и инкубировали 1 ч на шейкере (+37 °С, 290 RPM). Центрифугировали содержимое пробирок при 13000 g в течение 15 минут. Вносили полученные супернатанты в объёме 100 мкл в лунки, сенсibilизированные препаратом порина (5 мкг/мл), затем инкубировали в течение 1.5 ч на шейкере (+37 °С, 290 RPM). После трёхкратной отмывки добавляли 100 мкл кроличьего антимышиного конъюгата (1:1000), выдерживали 1 ч на термошейкере и вновь промывали лунки. Вносили по 100 мкл субстрата на основе *o*-фенилендиамина и выдерживали планшет в тёмном месте в течение 30 мин. Учёт результатов производили на микропланшетном ридере Anthos 2020» (Labtec, Австрия) при  $\lambda=492$  нм.

Методом иммуноферментного анализа выявлены различия в способности микросфер «OmpF» и «БСА» адсорбировать специфические антитела из антисыворотки к порину OmpF. Оптическая плотность в тех лунках, куда был внесён препарат надосадочной жидкости, полученной после инкубации микросфер «OmpF» с антисывороткой к порину в разведении 1:4500, уменьшалась, в среднем, в 2.5 раза по сравнению с контрольным препаратом этой антисыворотки в том же разведении. По результатам аналогичного опыта с контрольными микросферами «БСА» убыли оптической плотности по сравнению с антисывороткой к OmpF отмечено не было.

Таким образом, иммунохимически был подтверждён факт сенсibilизации микросфер порином OmpF.

### **3.3. Отработка способа регистрации сил отрыва микросфер от поверхности клеток**

Отработку способа регистрации сил отрыва производили с использованием микросфер «ЛПС-10». На подготовительном этапе производилась калибровка ловушки с находящейся в ней микросферой по параметру жёсткости в зависимости от мощности лазерного луча в диапазоне от 50 до 1500 мВт, и был подтверждён линейный характер зависимости жёсткости ловушки от мощности лазера. Из четырёх имеющихся в приборе фильтров, регулирующих интенсивность падающего на фотодиод излучения, опытным путём был выбран фильтр №3. Были также выбраны диапазоны частот регистрации (0.01 – 30 кГц) и исключения (0.2 – 20 кГц), используемые каждый раз при калибровке микросфер. Кроме того, были сформулированы критерии исключения опытов на стадии записи хронограммы. Частота регистрации смещений микросферы составила 1 кГц.

В процессе работы было отмечено резкое снижение коэффициентов жёсткости ловушки и чувствительности КвФД при пошаговом и автоматическом подведении столика с клеткой к находящейся в луче лазера микросфере, начиная с расстояний, меньших 2.0 – 2.5 мкм. В связи с этим начальное расстояние между эукариоцитом и микросферой во всех случаях составляло 4 мкм.

Вслед за калибровкой прибора выбирали удобную для измерений клетку и осуществляли подведение пьезостолика с клеткой к удерживаемой в оптической ловушке микросфере до их соприкосновения.

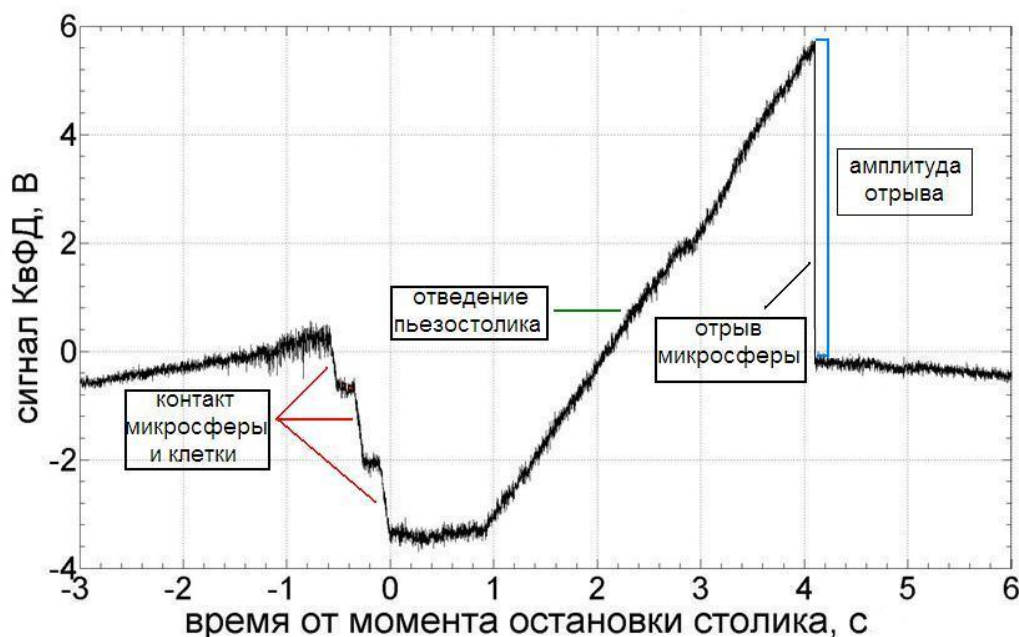


Рисунок 3 – Зависимость сигнала КвФД от смещения столика с макрофагом при подведении к микросфере (слева до точки «0») и при отведении от микросферы (направо от точки «0»).

В опыте выбранную клетку подводили пьезостоликом вдоль оси «X» прибора к удерживаемой лазерным лучом микросфере в ручном режиме шагами по 50 нм с расстояния порядка 4 мкм, контролируя процесс по хронограмме сигнала КвФД. Момент соприкосновения клетки с микросферой определяли по первому скачку сигнала детектора (точка «-0.6 с» на рисунке 3) повышенной амплитуды и изменённой направленности. После соприкосновения производили ещё два контрольных шага в условиях контакта объектов и останавливали пьезостолик. Таким образом, трём шагам столика перед остановкой соответствовала серия из трёх нисходящих уступов на кривой, представленной на рисунке 3. Спустя 1 с начинали автоматическое отведение столика с постоянной скоростью 0.1 мкм/с на расстояние 4 мкм.

Если контакт микросферы с поверхностью макрофага приводил к их связыванию, то при отведении столика микросфера вместе с клеткой равномерно смещалась относительно центра ловушки. Это смещение обуславливало линейный рост сигнала КвФД (участок 1.0–4.1 с на кривой рисунка 3). Амплитуду скачка сигнала пересчитывали в значение силы отрыва на основе указанных выше калибровок чувствительности и жёсткости лазерного пинцета, производимых перед каждой серией измерений.

### 3.4. Выявление роли О-боковых цепей ЛПС в адгезивности *Y. pseudotuberculosis* к макрофагам J774

Анализ гистограмм распределения сил отрыва показывает, в среднем, относительно высокую силу связи между макрофагами и микросферами «ЛПС-10» и «ЛПС-10+МКАт7». Микросферы «ЛПС-10+МКАт2» характеризовались существенно меньшей силой связи с макрофагами по сравнению с микросферами двух вышеуказанных типов и практически не отличались по оцениваемому свойству от контрольных микросфер, покрытых БСА (Рисунок 4).

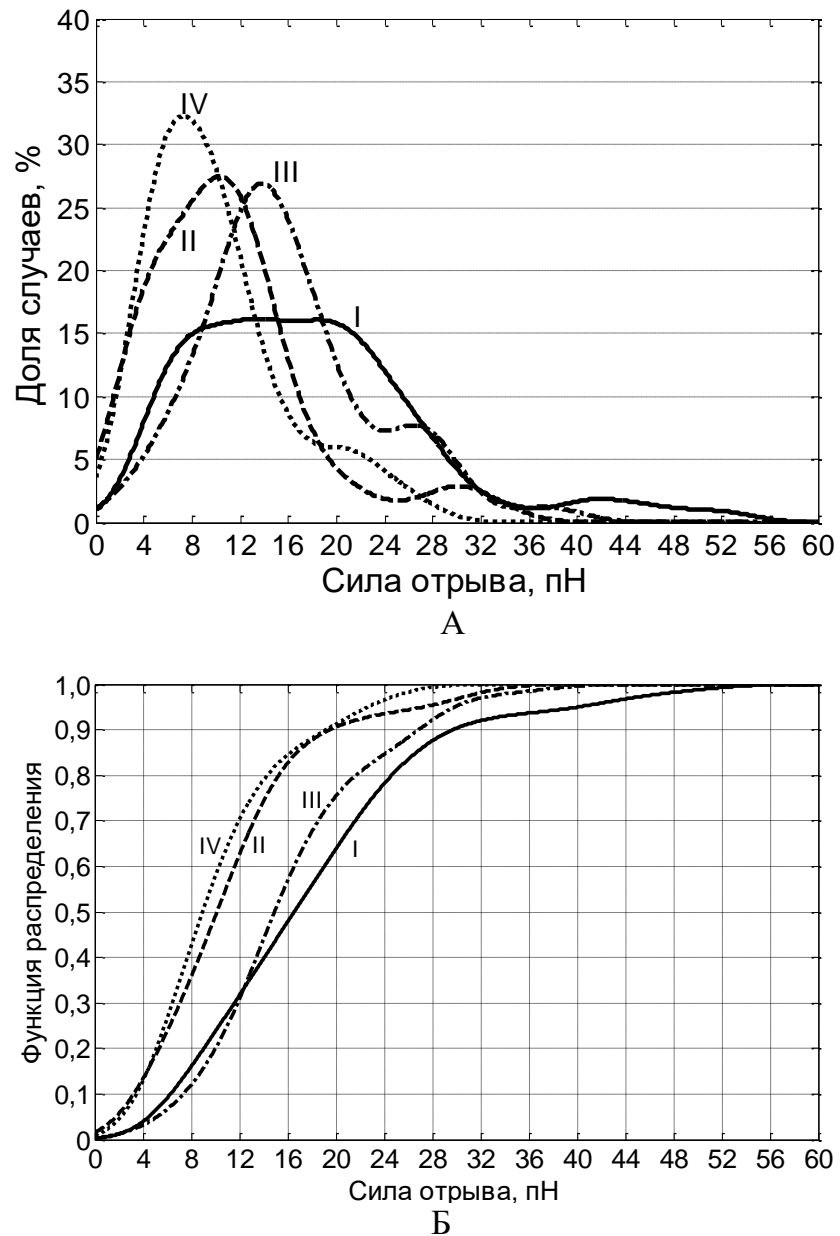


Рисунок 4 – Распределения, аппроксимирующие гистограммы измеренных сил отрыва от макрофагов микросфер, функционализированных с использованием ЛПС-10 (А), и соответствующие им интегральные распределения (Б) : I – для «ЛПС-10»; II – для «ЛПС-10+МКАт2»; III – для «ЛПС-10+МКАт7»; IV – для «БСА» (контроль).

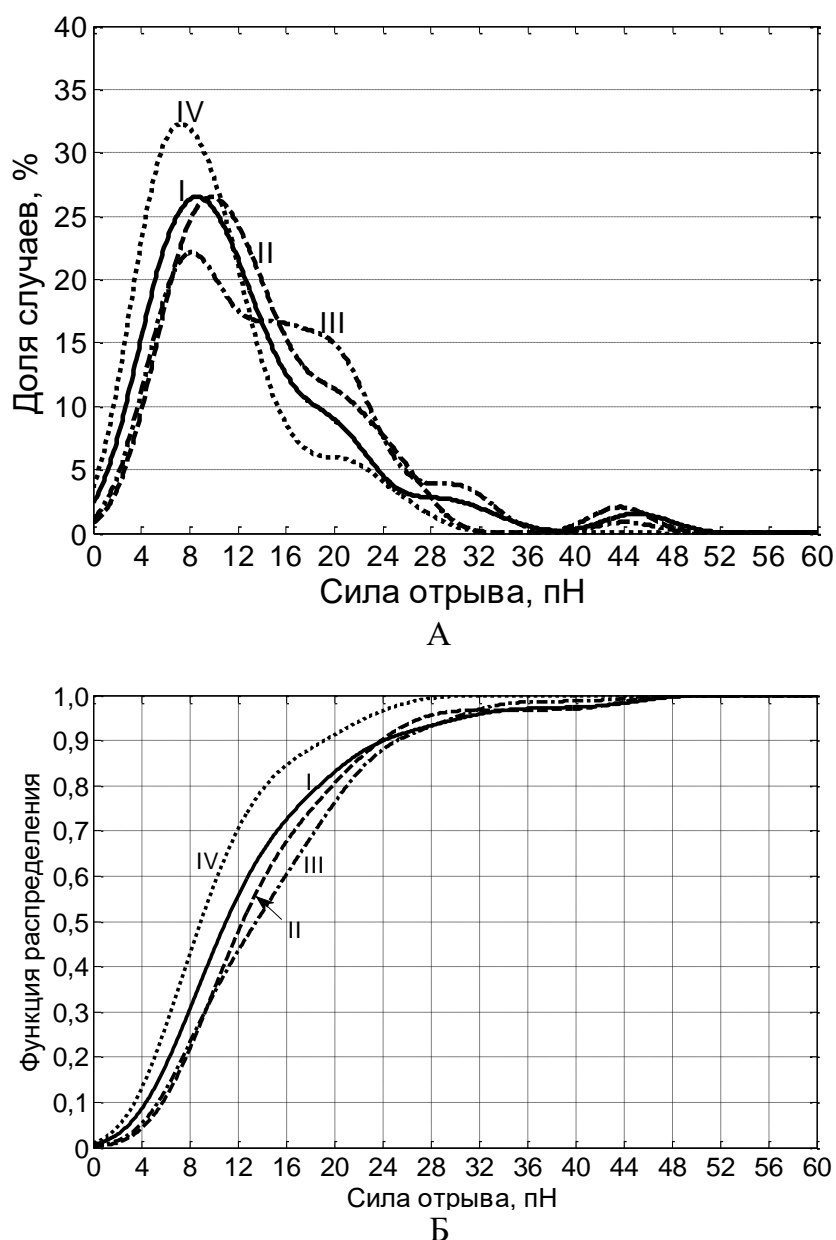


Рисунок 5 – Распределения, аппроксимирующие гистограммы измеренных сил отрыва от макрофагов микросфер, функционализированных с использованием ЛПС-EV (А), и соответствующие им интегральные распределения (Б): I – для «ЛПС-EV»; II – для «ЛПС-EV+ПЧС»; III – для «ЛПС-EV+МКАт2»; IV – для «БСА» (контроль).

На рисунке 5 представлены результаты обработки экспериментальных данных оценки сил отрыва от макрофагов микросфер, сенсibilизированных ЛПС-EV, без последующей обработки, а также с обработкой антителами двух типов. Эти результаты указывают на отсутствие значимых различий в силе взаимодействия микросфер, сенсibilизированных ЛПС-EV, безотносительно к тому, обрабатывались они или нет теми или иными антителами.

В таблице приведены средние значения сил отрыва, зарегистрированные по итогам опытов для разных типов микросфер, с указанием статистически значимых различий.

Таблица – Количественная характеристика сил отрыва от макрофагов функционализированных микросфер различных типов.

№ препарата микросфер	Тип препарата микросфер	Число измерений	$F_{\text{median}}$ , пН	$F_{\text{max}}$ , пН	$F_{\text{mean}}$ , пН	Номер препаратов с существенным ( $p < 0,01$ ) различием по $F_{\text{mean}}$
1	«ЛПС-10»	114	16.9	52.9	$17.8 \pm 10.0$	2,4,7
2	«ЛПС-10+МКАт2»	85	10.3	33.8	$11.0 \pm 6.7$	1,3,5,6
3	«ЛПС-10+МКАт7»	89	14.8	38.9	$15.9 \pm 7.1$	2,4,7
4	«ЛПС-EV»	186	10.7	46.8	$13.1 \pm 8.6$	1,3,7
5	«ЛПС-EV+ПЧС»	31	11.8	43.7	$14.1 \pm 8.0$	2,7
6	«ЛПС-EV+МКАт2»	74	13.6	44.2	$14.6 \pm 7.9$	2,7
7	«БСА»	118	9.2	29.5	$10.9 \pm 6.2$	1,3,4,5,6

Примечания:

$F_{\text{median}}$  – медиана значений силы отрыва;

$F_{\text{max}}$  – максимальная зарегистрированная сила отрыва;

$F_{\text{mean}}$  – среднее значение силы отрыва.

Представленные данные свидетельствуют об участии ЛПС в адгезии иерсиний к макрофагам. МКАт2, связываясь с комплементарными эпитопами О-боковых цепей сенситина микросфер – препарата ЛПС, снижают силу оцениваемого взаимодействия. МКАт7, распознающие антигенную детерминанту наружной мембраны иерсиний белковой природы и поэтому неспособные специфически связываться с микросферами, покрытыми ЛПС, указанный эффект не вызывают (асцитная жидкость с МКАт7 использована в работе в качестве референс-препарата как наиболее близкий аналог таковой, содержащей МКАт2, – обе асцитные жидкости получали от сингенных мышей линии BALB/c). Различия между микросферами «ЛПС-10» и «ЛПС-10+МКАт2» по средней силе связывания с макрофагами достоверны ( $p < 0.01$ ), в то время как микросферы «ЛПС-10» и «ЛПС-10+МКАт7» различаются по силе связывания статистически незначительно (Таблица).

Микросферы, сенсibilизированные препаратом ЛПС-EV, в среднем, характеризуются меньшей, по сравнению с микросферами ЛПС-10, силой связывания с макрофагом (вполне вероятно, вследствие отсутствия в ЛПС-EV О-боковых цепей) и большей – сравнительно с контрольными микросферами (различие достоверно для  $p < 0.01$ ). Последнее указывает на участие липида А и (или) коровой области ЛПС во взаимодействии клеток иерсиний с эукариотами. Однако значимость указанной составляющей в адгезивности, очевидно, ниже по сравнению с О-боковыми цепями ЛПС. Средняя сила связывания микросфер, покрытых ЛПС-EV, практически не зависит от того, инкубировались они или нет с двумя антителосодержащими препаратами – ПЧС

и МКАт2 (Рисунок 5, Таблица). Такой результат был ожидаем для МКАт2, не способных специфически связываться с ЛПС-EV. Отсутствие значимого влияния поливалентной ПЧС на исследуемое взаимодействие можно объяснить либо неспособностью имеющихся в ней антител к кору и (или) липиду А экранировать на молекуле ЛПС-EV структуры, играющие роль в связывании, либо отсутствием в сыворотке достаточного для проявления эффекта «блокировки» количества названных антител.

Полученные результаты показали, что обработка микросфер некомплементарными сенситину антителами (микросферы «ЛПС-10+МКАт7» и «ЛПС-EV+МКАт2») приводила к изменению формы гистограмм (Рисунки 4 и 5). Вместе с тем, средние значения силы отрыва для микросфер «ЛПС-10» и «ЛПС-10+МКАт7», а также «ЛПС-EV» и «ЛПС-EV+МКАт2» разнились незначительно (Таблица). Зарегистрированное влияние обработки сенсibilизированных ЛПС микросфер гетерологичными антителосодержащими препаратами на форму гистограмм может объясняться наличием в препаратах сенситина некоторого количества примесных белков – выделенные и использованные в работе препараты ЛПС содержали до 1.5% белка. Применительно к микросферам «ЛПС-10+МКАт7» помимо возможного специфического взаимодействия МКАт7 с примесным белковым эпитопом ЛПС-10 допустимо предположить и неспецифическое связывание антител с поверхностью сенсibilизированных микросфер. Так, для ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий, в том числе и иерсиний, показана способность связывать иммуноглобулины в области Fc-фрагмента. Такие иммуноглобулинсвязывающие белки идентифицированы и в клетках *Y. pseudotuberculosis* [Сидорин Е.В., 2006]. Кроме того нельзя исключить возможность неспецифического связывания с примесными белками сенситина отличных от антител компонентов асцитной жидкости мышей и поливалентной сыворотки лошади. Показано, например, что Рsa-антиген *Y. pestis* способен связываться не только с Fc-областью антител, но и с аполипопротеином В100 неиммунной сыворотки человека [Makoveichuk E., 2003]. С другой стороны, обсуждаемое изменение формы гистограмм может объясняться и неспецифическим взаимодействием компонентов асцитной жидкости и лошадиной сыворотки с целевым сенситином – молекулами ЛПС.

Разработанный нами способ оценки зависимости адгезивности микроба к эукариотам от химического состава ЛПС основан на возможности «блокировки» того или иного компонента ЛПС специфическими антителами и регистрации методом оптической ловушки соответствующего изменения силы отрыва. Во всяком случае, применительно к выяснению роли О-боковых цепей в исследуемом взаимодействии, он может иметь преимущество перед подходом, использующим в этих целях варианты микроорганизма, экспрессирующие О-антиген различного размера [Ivanov I.E., 2010]. В последнем случае уменьшение «длины» О-антигена может влиять на силу отрыва, обусловленную не только (а может быть и не столько) снижением количества углеводных остатков антигена на поверхности клетки, изменением ее морфологии, но и возрастом вклада в адгезивность подлежащих структур наружной мембраны, экранируемых О-боковыми цепями ЛПС. На это указывают и авторы цитируемых исследований [Lu Q., 2011; Burks G.A., 2003].

Известно, что химический состав ЛПС грамотрицательных бактерий, в том числе и представителей рода *Yersinia*, зависит от внешних условий, в частности, температуры, при которой происходят их рост и размножение [Skurnik M., 2003; Knirel Y.A., 2012]. В свою очередь, химический состав ЛПС влияет на биологические свойства иерсиний



[Holst O., 2002]. С повышением температуры культивирования бактерий *Y. pseudotuberculosis* с комнатной до 37 °С существенно снижается оснащенность ЛПС О-боковыми цепями [Byvalov A.A. et al., 2014; Skurnik M., 2003]. По-видимому, высокая концентрация О-антигена на поверхности бактерий при относительно низких температурах может способствовать *Y. pseudotuberculosis* выживать в объектах окружающей среды: водоёмах, почве, растениях, холоднокровных животных. Вместе с тем показана более выраженная вирулентность для лабораторных животных так называемых «холодовых» культур этого возбудителя по сравнению с культурами, выращенными при температуре 37 °С [Сомов Г.П., 2001], что может объясняться, в том числе, и повышенной экспрессией О-антигена на поверхности микробной клетки. О-антиген, являясь компонентом ЛПС, в значительной мере определяет его вклад в патогенетический потенциал грамотрицательных бактерий, особенно на первых этапах взаимодействия с клеткой хозяина, участвует в нейтрализации бактерицидного действия сыворотки, катионных белков, проявлении антифагоцитарной активности, в том числе и путем влияния на экспрессию других факторов вирулентности [Bengoechea J.A., 2004; Bengoechea J.A., 2004; Tang K., 2007]. Одно из общих проявлений вирулентных свойств энтеропатогенных иерсиний, с которым связывают наличие О-антигена, – колонизация тканей хозяина [Holst O., 2003]. Вполне вероятно, что механизм названной колонизации опосредуется показанным в нашей работе участием О-антигена в адгезивности *Y. pseudotuberculosis* к эукариотам. Полученные результаты подтверждают значимость О-антигена как одного из ключевых факторов патогенности этого возбудителя, обеспечивающих эффективность его первичного контакта с клеткой хозяина с последующим развитием инфекционного процесса.

### **3.5. Выявление роли порина OmpF в адгезивности *Y. pseudotuberculosis* к макрофагам J774**

Сравнение формы аппроксимирующих кривых для микросфер, покрытых OmpF и БСА (контроль), показало наличие достоверных различий средних сил отрыва, которые составили  $15.1 \pm 7.3$  пН и  $10.9 \pm 6.2$  пН, соответственно. По указанному параметру микросферы «OmpF» близки к микросферам «ЛПС-10» и «ЛПС-10+МКАт7» максимальная же сила отрыва, зафиксированная в опытах при использовании OmpF-микросфер, не превышает 36 пН (Рисунок 6).

К настоящему времени специфически взаимодействующие с поринами рецепторы эукариотических клеток не обнаружены [Galdiero S., 2012]. Вместе с тем известно, что порины обладают выраженными иммунобиологическими свойствами, стимулируя синтез ряда провоспалительных цитокинов. Так, порин *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* стимулирует синтез TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, TGF макрофагами, IL-4 и IFN- $\gamma$  – лимфоцитами, IL-6 – клетками лимфомы U937 [di Donato A., 1986; Galdiero F., 1984]. На этом основании ряд авторов предполагают вовлечение в процесс распознавания пориновых антигенов ряда рецепторов на поверхности иммунокомпетентных клеток, среди которых TLR1, TLR2, TLR6 и MD2 [Banerjee P., 2008; Massari P., 2002; Ray A., 2003].

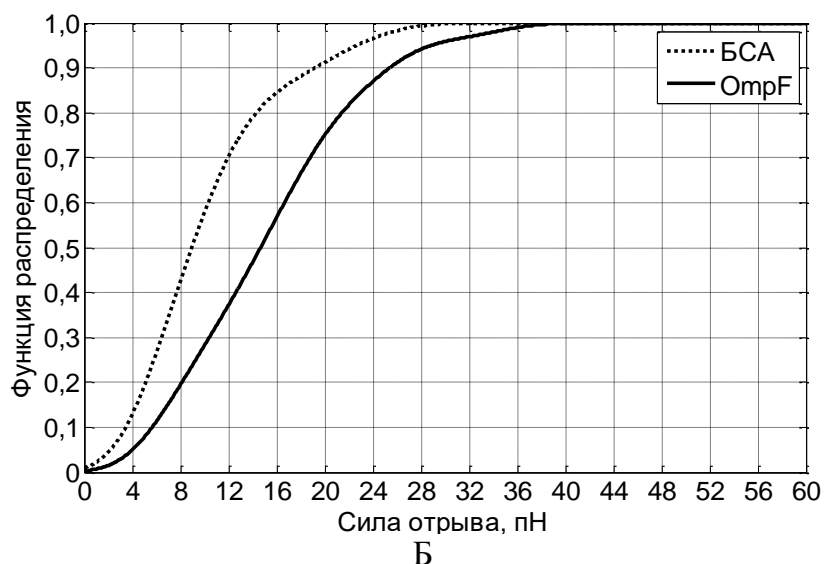
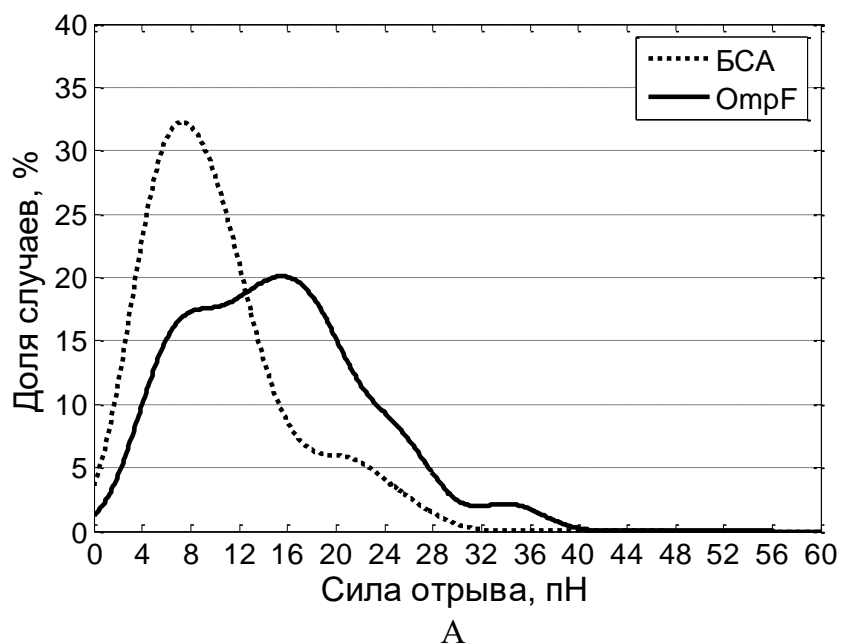


Рисунок 6 – Распределения, аппроксимирующие гистограммы измеренных сил отрыва от макрофагов микросфер, функционализированных с использованием порина OmpF, по сравнению с контролем (BSA) (А) и соответствующие им интегральные распределения (Б).

Противоречивость сведений относительно участия тех или иных рецепторов клеток-мишеней в распознавании поринов объясняется вариабельностью молекул последних по аминокислотной последовательности, структуре молекул. В нашем случае, принимая во внимание факт наличия статистически достоверных различий в силе отрыва между микросферами, сенсibilизированными OmpF, и контрольными микросферами, можно предположить неспецифическое электростатическое взаимодействие между положительно заряженными участками порина и белковыми (или липидными) молекулами в составе цитоплазматической мембраны эукариоцитов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На подготовительном этапе исследования был разработан и эмпирически обоснован способ регистрации сил отрыва иммунохимически функционализированных микросфер от поверхности эукариотических клеток с применением метода оптической ловушки.

По данным блокирования микросфер «ЛПС-10» специфическими к О-боковым цепям (МКАт2) и гетерологичными (МКАт7) моноклональными антителами достоверное снижение силы связывания показано только в первом случае. Это свидетельствует о значимости О-боковых цепей в адгезии клеток *Y. pseudotuberculosis* к макрофагам J774.

Адгезивность препарата ЛПС-EV, продуцируемого клетками *Y. pestis*, которые не способны к биосинтезу О-антигена, оказалась меньшей по сравнению с адгезивностью препарата ЛПС-10, но более выраженной по сравнению с контролем (БСА). Эти обстоятельства указывают на участие липида А и (или) коровой области ЛПС во взаимодействии микробных клеток с эукариоцитами.

По результатам опытов с использованием микросфер, сенсibilизированных препаратом порина OmpF из наружной мембраны *Y. pseudotuberculosis*, можно утверждать факт участия данного белка в адгезии микробных клеток к поверхности эукариоцитов. Учитывая отсутствие прямых экспериментальных данных, касающихся роли известных рецепторов в связывании с поринами, можно предполагать неспецифический характер такого взаимодействия.

## ВЫВОДЫ

1. Разработан метод сенсibilизации полистироловых микросфер препаратами липополисахарида *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis* а также порина OmpF *Yersinia pseudotuberculosis* для оценки силовых характеристик взаимодействия в модельной системе «функционализированная микросфера – эукариоцит» методом оптической ловушки.
2. Подтверждён факт сенсibilизации микросфер препаратом порина OmpF методом твердофазного иммуноферментного анализа и препаратом ЛПС, выделенным из биомассы «холодового» варианта *Yersinia pseudotuberculosis*, с помощью трансмиссионной электронной микроскопии при использовании конъюгатов коллоидного золота с моноклональными антителами к О-боковым цепям.
3. Разработан способ определения силы взаимодействия в системе «модельная микросфера – эукариоцит» с использованием лазерного пинцета. Обоснованы критерии контакта микросфер с поверхностью эукариоцита в процессе сближения объектов на основе регистрируемых изменений вольтажного сигнала квадрантного фотодетектора.
4. С использованием набора моноклональных антител установлена значимость О-боковых цепей липополисахарида в адгезивности *Yersinia pseudotuberculosis* к макрофагам J774.
5. Показано, что порин OmpF является неспецифическим белковым адгезином *Yersinia pseudotuberculosis*.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в научных журналах, включенных в список ВАК:

1. Byvalov, A.A. Immunochemical activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* B-antigen / A. A. Byvalov, L. G. Dudina, A. V. Chernyad'ev, I. V. Konyshev, S. G. Litvinets, Yu. S. Ovodov // Molecular Genetics, Microbiology and Virology. – 2015. – V. 30. – N 2. – P. 93– (авт. 0,27 п.л.).
2. Бывалов, А.А. Иммунохимическая природа рецепторов бактериофага псевдотуберкулёзного диагностического / А.А. Бывалов, Л.Г. Дудина, И.В. Конышев, С.Г. Литвинец, Е.А. Мартинсон // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 160. – N 11. – С. 622–625 (0,09 п.л.).
3. Конышев, И.В. Метод оценки сил адгезии в системе «модель прокариота – эукариот» с использованием оптической ловушки / И.В. Конышев, В.Л. Кононенко, А.А.Бывалов // Медицинский академический журнал. – 2016. – Т. 16. – N 3. – С. 137–140 (авт. 0,20 п.л.).
4. Бывалов, А.А. Влияние О-боковых цепей липополисахарида на адгезивность *Yersinia pseudotuberculosis* к макрофагам J774, установленное методом оптической ловушки / А.А. Бывалов, В.Л. Кононенко, И.В. Конышев // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53. – N 2. – С. 234–243 (авт. 0,46 п.л.).

### Патенты:

1. Способ количественной оценки силы связывания сенсibilизированной полистироловой микросферы с эукариотом линии J-774 на основе метода оптической ловушки: пат. 2604191 Рос. Федерация: С12Q1/02, G01N33/53, A61B10/00 / А.А. Бывалов, В.Л. Кононенко, И.В. Конышев, С.Г. Литвинец, Е.А. Мартинсон; заявитель и правообладатель Вятский госуд. ун-т. – №2604191; заявл. 23.07.2015; опубл. 10.12.2016, Бюл. №34. – 11 с.

### Материалы конференций:

1. Конышев, И.В. Методические подходы к изучению взаимодействия клеток бактерий с клетками млекопитающих / И.В. Конышев // Материалы докладов II Всероссийской (XVII) молодежной научной конференции (с элементами научной школы) «Молодежь и наука на севере». Сыктывкар, 2013. – Т.1. – С.179–180.
2. Конышев, И.В. Исследование биофизических механизмов межклеточного взаимодействия в системе «про- и эукариот» с помощью оптического пинцета / И.В. Конышев, А.А. Бывалов, Л.Г. Дудина, Ю.Д. Ерёменко, В.М. Славянский // Материалы Всероссийской ежегодной научно-практической конференции «Общество, наука, инновации». – г. Киров, 2014. – С. 100–101.
3. Кононенко, В.Л. Исследование сил связывания в модельной системе «эукариот – липополисахарид бактерий рода *Yersinia*» методом лазерного пинцета / В.Л. Кононенко, И.В. Конышев, А.А. Бывалов // Сборник трудов XI Всероссийского съезда по фундаментальным проблемам теоретической и прикладной механики, 20-24 августа 2015 г., г. Казань. Издательство Казанского (Приволжского) федерального университета, 2015. – С. 1932–1934.
4. Бывалов, А.А. Роль О-боковых цепей ЛПС в адгезии *Yersinia pseudotuberculosis* к макрофагам, оценённая методом оптической ловушки / А.А. Бывалов, В.Л. Кононенко,

- И.В. Конышев // Материалы V съезда биофизиков России, 10-14 октября 2015 г., г. Ростов-на-Дону. Изд-во Южного федерального университета, 2015. – Т. 2. – С. 214.
5. Кононенко, В.Л. Методики регистрации смещений и сил взаимодействия сенсibilизированных микросфер-зондов с клетками методом оптического пинцета в условиях «тени» исследуемого объекта / В.Л. Кононенко, А.А. Бывалов, И.В. Конышев, Ф.И. Атауллаханов // Материалы V съезда биофизиков России, 10-14 октября 2015 г., г. Ростов-на-Дону. Изд-во Южного федерального университета, 2015. – Т. 2. – С. 48.
6. Дудина, Л.Г. Оценка антигенных свойств бактерий рода *Yersinia* с помощью моноклональных антител / Л.Г. Дудина, И.В. Конышев // Материалы XIII Всероссийской молодёжной научной конференции Института физиологии Коми НЦ УрО РАН «Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике». – г. Сыктывкар, 2014. – С. 43–46.
7. Конышев, И.В. Влияние температуры культивирования клеток *Yersinia pseudotuberculosis* на их адгезивные и инвазивные свойства / И.В. Конышев, Л.Г. Дудина // Материалы XIII Всероссийской молодёжной научной конференции Института физиологии Коми НЦ УрО РАН «Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике». – г. Сыктывкар, 2014. – С. 65–66.
8. Конышев, И.В. Отработка методических подходов к определению силы связи в системе «эукариоцит-прокариоцит» методом оптической ловушки / И.В. Конышев, В.С. Белозёров // Материалы Всероссийской ежегодной научно-практической конференции «Общество, наука, инновации». – Киров, 2016. – С. 1–9.

**Е-mail автора:** konyshevil@yandex.ru

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание Казанского федерального университета, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Учёному секретарю Диссертационного совета Д 212.081.36 Абрамовой Зинаиде Ивановне, факс: (843) 238-76-01. Е-mail: [ziabramova@mail.ru](mailto:ziabramova@mail.ru).

Подписано в печать 02.05.2017. Печать цифровая. Бумага для офисной техники.

Усл. печ. л. 1,61. Тираж 100 экз. Заказ № 4239.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Вятский государственный университет».

610000, г. Киров, ул. Московская, 36, тел.: (8332) 74-25-63, <http://vyatsu.ru>